

EPILEPTİK NÖBET GEÇİREN GEBE SIÇANLARIN YENİDOĞANLARINDA KARACİĞER DOKUSUNUN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

HISTOLOGICAL STUDY OF LIVER TISSUE FROM NEWBORN RATS OF MOTHERS WITH EPILEPTIC SEIZURES DURING PREGNANCY

Utku ATEŞ¹

Meral BAKA¹

Yiğit UYANIKGİL¹

Mine YURTSEVEN¹

Mete AKISÜ²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İZMİR

Anahtar sözcükler : Epilepsi, Hamilelik, yenidoğan, sıçan, karaciğer

Keywords : Epilepsy, Pregnancy, Newborns, Rat, Liver

ÖZET

Günümüze kadar olan literatürler tarandığında, annenin gebelikte geçirdiği epileptik nöbetin yenidoğanlar üzerine olası etkilerini inceleyen çalışmaların yetersiz sayıda olduğunu görüyoruz. Sağlıklı yeni nesillere sahip olma hedeflerine katkıda bulunmak adına deneysel olarak gebe ratlarda oluşturulan epileptik model ile gebelikte geçirilen epileptik nöbetin, yenidoğan karaciğer dokularına etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla 225–250 gr ağırlıklı erişkin sıçanlar herbirinde altı sıçan olmak üzere üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanların hipokampal CA3 bölgesine gebeliğin 13. gününde stereotaksik girişimle 400 IU penisilin-G uygulandı ve sıçanların akut grand mal epileptik nöbet geçirilmeleri sağlandı. İkinci gruba intrahipokampal serum fizyolojik uygulandı (sham grup). Üçüncü grup ise kontrol olarak cerrahi işlem yapılmadan bırakıldı. Tüm gruptaki sıçanların yavruları doğdukları gün intrakardiyak perfüzyon ile tespit edildi ve yenidoğan karaciğer dokuları ışık ve elektron mikroskopik olarak değerlendirildi.

Kontrol grubunda, yenidoğan karaciğer dokusuna özgü histogenezis sürecinde normal gelişim ve maturasyon devamını gösteren bulgular saptanırken epileptik sıçanlara ait yenidoğanların karaciğer dokularının histolojisi gecikmiş maturasyon ile uyumluydu.

SUMMARY

Databases show insufficient number of studies investigating the possible effects of mother's epileptic seizures during pregnancy on the newborns. In the name of contributing to the idea of having healthy new generations this study was planned to investigate the histological alterations in the liver tissues of newborn rats from mothers experiencing epileptic seizures during pregnancy.

For this purpose; adult rats (225–250 gr) were separated into three groups each having 6 rats. First group was injected with 400 IU penicillin-G into the intrahippocampal CA3 region with stereotaxic device on the 13th day of pregnancy and these rats experienced acute grand mal epileptic seizure after penicilline administration. Second group was injected with intrahippocampal saline (sham group) and the third group served as the control group. Pups were sacrificed by lethal dose anesthesia on the neonatal first day and perfused with intracardiac fixative. Liver tissues was dissected, both light and electron microscopy were performed on liver slices.

While, liver tissue of the newborn rats from control group showed normal hepatogenesis and hepatocellular maturation, histology of liver tissue of pups from epileptic mothers confirmed delayed maturation.

Yazışma adresi: Utku ATEŞ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İZMİR

Makalenin geliş tarihi : 22.03.2004 ; Kabul tarihi : 10.06.2004

GİRİŞ

Epilepsi, coğrafi konum, cins, ırk ayrımı olmaksızın genel populasyonda görülme sıklığı % 0,5–10 arasında olan bir hastalıktır (1,2). Epilepsi hastalarının yaklaşık %65'inde belirli bir neden saptanamamaktadır. Nedenin belirlenebildiği hallerde ise en sık rastlanan sebepler arasında; beyin dokusunda hasara neden olan yaralanmalar; beyin tümörleri, (Meningit, ensefalit, kızamık, kızamıkçık, difteri gibi) enfeksiyonlar, hamilelikte geçirilen bazı enfeksiyonlar, doğum travmaları, yüksek ateş, kurşun veya karbonmonoksit zehirlenmesi, beyin kan akımında azalma ya da duraklamaya neden olan kalp-damar hastalıkları, alkol bağımlılarında alkol yoksunluğu yer almaktadır (3, 4). Epileptik nöbetlerin patofizyolojisi her zaman tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca tüm epilepsi nöbetlerinde aynı patofizyoloji de geçerli değildir (5-8).

Annelerdeki epileptik nöbetlerin, yenidoğanlar üzerine etkisi klinik gözlemlerle belirtilse de histopatolojik etkisinin gözlemleri yetersiz düzeydedir (9).

Hamile sıçanlarda deneysel epilepsi oluşturarak, epileptik nöbetin yenidoğan hepatobilier sistem maturasyonuna etkisini ışık ve elektron mikroskopik olarak inceleyerek konuya katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

GEREÇ YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'nun onayı ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 225–250 gr. arasında değişen Wistar Albino dişi sıçanlar ile yapıldı. Estrus siklus tayini için günlük vaginal smearlar alındı (10,11). Proestrus dönemin gecesinde fertil erkek sıçanlarla çiftleştirildi. Hamileliğin 13.gününde stereotaksi aleti ve sıçan stereotaksik atlas yardımı ile (12) bregma 0 noktası kabul edilerek kaudal 5,5 mm. lateral 4,5 mm. ve derinlik 7,0 mm. koordinatlarına karşılık gelen ve afferent ve efferent bağlantıları yoğun olan (13) intrahipokampal CA3 bölgesine 400 IU penisilin-G verilerek, sıçanların (n=6) akut grand mal epileptik nöbet geçirilmeleri sağlandı. Sham (n=6) grubuna aynı işlemler serum fizyolojik verilerek yapıldı. Kontrol grubu (n=6) ise cerrahi işlem yapılmadan bırakıldı. Cerrahi girişim yapılanlara kamera ile (Sony 360x Handycam) kayıt tutuldu. Daha sonra ayrı kafeslere ayrılan sıçanların doğum yapması beklendi. Doğumdan hemen sonra letal dozda ketalar (0.15 mg/ 100gr.) ve rompun (0.02 ml/100gr.) ile anestezi edilen yenidoğan sıçanlar intrakardiyak perfüzyon ile tespit edildi. Fiksatif olarak, 0,1 M cacodylate tamponlu %2'lik glutaraldehit ve %2'lik paraformaldehit solüsyonu kullanıldı. Disseke edilen karaciğer dokusu aynı fiksatifte 24 saat bekletildi. Rutin takibi yapılan parçaların epon bloklarından Reichert Austria Nr.313864 ultramikrotomda alınan yarı ince kesitler (1 mikron) ışık mikroskopi için Toluidine blue ile boyanarak incelendi. İnce kesitler ise elektron mikroskopi için uranyl asetat ve kurşun sitrat ile boyanıp Zeiss EM-9 Transmisyon Elektron Mikroskobu'nda incelenerek, elektronmikrograflar elde edildi.

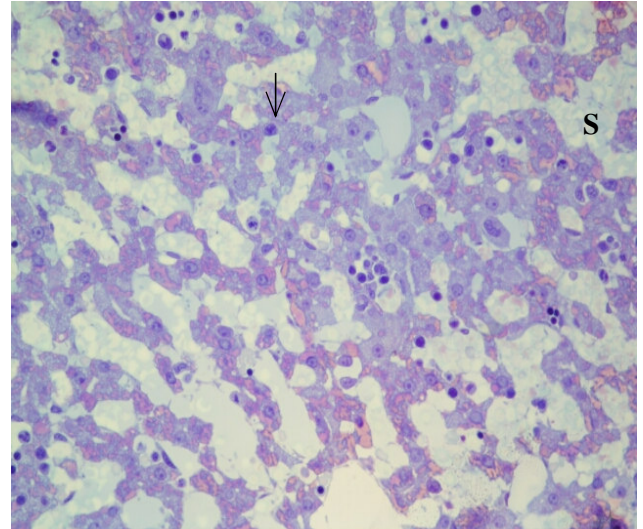
narak incelendi. İnce kesitler ise elektron mikroskopi için uranyl asetat ve kurşun sitrat ile boyanıp Zeiss EM-9 Transmisyon Elektron Mikroskobu'nda incelenerek, elektronmikrograflar elde edildi.

BULGULAR

Akut dönemdeki bulgularda stereotaksik girişimden sonraki 30 dakika ve 1 saatlik zaman aralığında genellikle sol ekstremiteleden başlayan ve jeneralize dağılan tonik-klonik tarzda kasılmaların spontan aralıklarla devam ettiği gözlemlendi. Normalde 21–22. günde doğumları beklenen olguların 24–26. günlerde doğumları postmatüre olarak gerçekleşti. Kontrollere göre yenidoğan bakışında ise prematüre ve düşük kilolu doğan görünümü hakimdi.

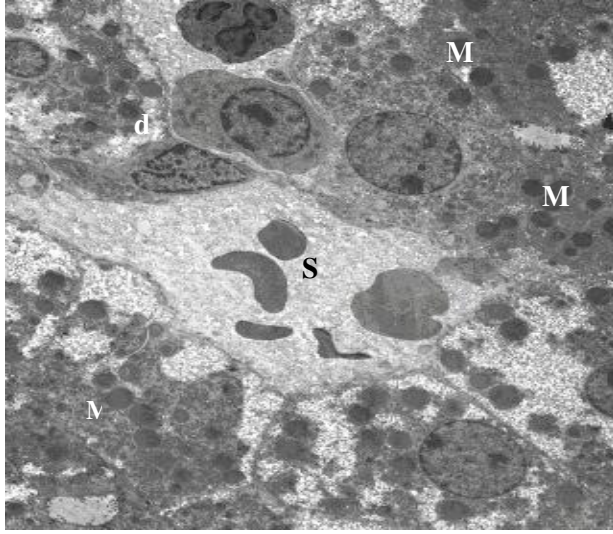
Yenidoğan kontrol grubunda ışık mikroskopik fotoğraflarda yer yer mitotik figürlere rastlandı. Hücre sınırları düzgün ve sinüzoidler normal, hepatik kordonlar düzenli olarak izlendi. Hepatik kordonlar yetişkin sıçan karaciğerindekilere benzerlikler gösteriyordu. Karaciğer normal maturasyon dönemi histolojisi ile uyumluluk gösterdi (Şekil 1).

Kontrol grubuna ait yenidoğan karaciğer dokusu elektron mikroskopik görüntülerde; Disse mesafesi normal, hücre sınırları belirgin olarak saptandı. Sitoplazmada mitokondri sayısı artmış ve şekilleri belirginleşmişti. Kan hücreleri normal sayıda saptandı (Şekil2).



Şekil 1. Kontrol grubu yenidoğan KC dokusu H&E X40

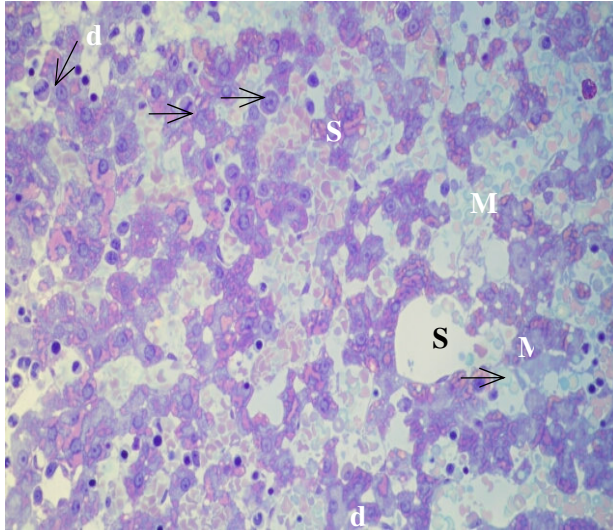
(→ Mitotik figürler; S sinüzoidler)



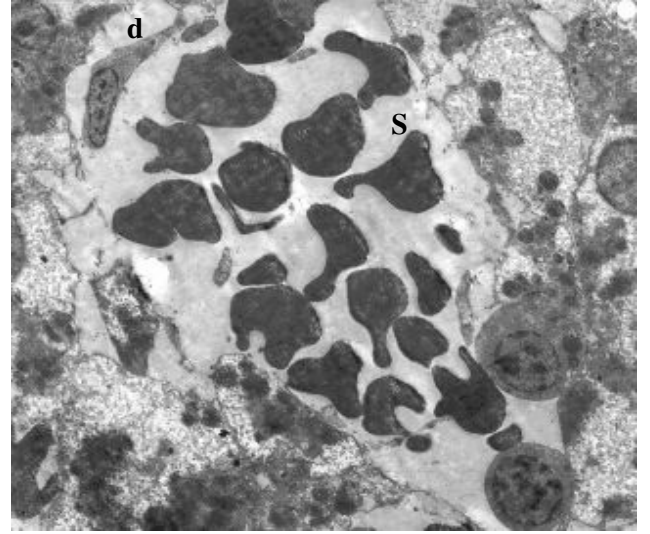
Şekil 2. Kontrol grubu yenidoğan KC dokusu, TEM X5200
(d disse aralığı, S sinüzoidler, M mitokondri)

Deney grubuna ait karaciğer dokusu; sinüzoidler genişlemiş, ışık mikroskopik görüntülerde mitotik figürler artmıştır. Sinüzoidlerdeki genişlemeyle birlikte kan hücrelerinde artış saptanmıştır (Şekil 3).

Deney grubu elektronmikroskopik bulgulara Karaciğer'de disse aralığı ve sinüzoidler genişlemiş ve sinüzoidal alanlarda kan hücreleri fazla sayıda izlendi. Mitokondriler az sayıda saptandı (Şekil 4).



Şekil 3. Deney grubu yenidoğan KC dokusu H&E X40
(→ Mitotik figürler, S sinüzoidler)



Şekil 4. Deney grubu yenidoğan KC dokusu TEM X5200
(d disse aralığı, S sinüzoidler, M mitokondri)

TARTIŞMA

Bu çalışmada kullanılan deneysel epilepsi modeli grand mal epileptik nöbetlere neden olan intrakortikal penisilin modelidir. Bu model iktal ve interiktal elektriksel değişimleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Penisilin lokal kullanımından sonra postsinaptik GABA_A reseptörlerini blokladığı bilinmekte, fakat kronik patolojik değişikliklere neden olduğu bilinmemektedir (14,15) Deneysel epilepsi yaratmak için kullanılan penisilin, intrakortikal (16- 19) veya parenteral (14,15) olarak uygulanmakta ve kimyasal konvülsiyonlar saptanmaktadır. Gebe kadınlarda penisilinlerle yapılan çalışmalarda fetüse zararlı etkiler oluştuğuna dair herhangi bir kanıt gösterilmemiştir. Ancak gebe kadınlarda bu ilaçların fetüse zararlı olmadığını kati olarak gösteren yeterli ve tam kontrollü bir çalışmaya da rastlanmamıştır. İntrakortikal penisilin uygulamalarında hamile olmayan sıçanlar için 2000 IU'den (20) 500 IU'ye (21) kadar değişen miktarda penisilin G kullanılmıştır. Hamile sıçanlarla ilgili araştırmada uygulama dozu 400 IU tercih edilmiştir (22).

Klinik gözlemler; özellikle 1. ve 3. trimesterde nöbet sıklığındaki artışın hamilelikteki kan seviyelerindeki değişime bağlı olduğunu ve özellikle jeneralize tonik-klonik (grand mal) nöbetlerin diğer nöbetlere oranla daha fazla tehlike oluşturarak düşüklere neden olabildiğini göstermektedir. Jeneralize tonik-klonik nöbetler sırasında yaşanan travmalar; obstetrik yaralanmalara hatta düşüklere neden olabilmekte, ayrıca hem anne hem fetüs için hipoksi, asidozis riski taşımakta ve merkezi sinir sistemi başta olmak üzere tüm sistemlerdeki hücrelerde yaşanan hipoksik sürece bağlı olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz zararlanmaya neden olmaktadır. Bu sayede status epileptikusda anne ve bebeğe ait yüksek mortalite oranla-

rını hipoksik sürecin uzaması ile açıklayabiliriz. Malformasyon oranı, epilepsili annelerin çocukları için %4–6, sağlıklı anneler için ise %2–3 arasındadır (23). Epilepsili annelerin yenidoğanlarında malformasyon oranının 2 kat daha fazla olmasının nedeni embriyogenez esnasındaki organların farklılaşma ve maturasyonunda görev alan hücrelerin hipoksik koşullardan etkilenecek zedelenmesi ve normal işlevlerini yerine getirememeleri olabilir.

Yenidoğan memeli hücrelerinin, anneye bağımlı oksijenlenme dönemi olan intrauterin hayata ve özellikle oksijene serbestçe ulaşılabilen ekstrauterin hayata başarılı bir şekilde adaptasyonu için normal ve zamanında gelişim gösteren mitokondrilere sahip olması gerekmektedir. Perinatal dönem esnasında sıçanlarda hepatositlere ait mitokondrielerin yapısal ve fonksiyonel olarak belirgin değişiklikler geçirdiği gösterilmiştir. Bu süreçte, mitokondri proliferasyonu, mitokondri sayı artımı ve organel farklılaşması başlıca rolü oynar (24- 28).

Hemen hemen tüm memelilerde intrauterin yaşamın sonlarına kadar hemopoetik bir görev üstlenmiş olan karaciğer, neonatal dönemde esas görevlerini üstlenmeye başlar. Bunlar (aminoasit deaminasyonu ve kullanımı, albümin, immüoglobulin, pıhtılaşma faktörleri gibi) proteinlerin sentezi; (fosfolipid, trigliserit ve kolesterol gibi) lipidlerin sentezi, (karbonhidrat sentezi, glikojen depolama, glukoneogenez ve glikoliz gibi) karbonhidrat metabolizmasıyla ilgili işlevlerdir. Bu görevleri yerine getirebilmesi için hepatositlerin maturasyonunda ve organizasyonunda aksama olmamalıdır. Hepatositlerin gerek ultrastrüktürel, gerekse fonksiyonel olarak maturasyonlarını tamamlamasında en önemli basamak mitokondrial farklılaşma ve proliferasyondur. Mitokondrial proliferasyon normal yaşam boyunca devam eden bir süreçtir. Doğumdan sonraki mitokondrial enzimatik aktivitelerin indüksiyonu ile ortamdaki organeller proliferasyon olurlar (24,25,29-33). Farklılaşmanın aksine proliferasyon protein sentezinin transkripsiyonel düzeyinde kontrol edilir (34). Diğer taraftan, mitokondrial farklılaşma sıçanlarda doğumdan hemen sonra postnatal birinci saat içinde çok hızlı bir şekilde oluşmaktadır (26, 30, 35-37). Bu farklılaşma sürecinde, var olan mitokondriyel ultrastrüktürel, moleküler ve fonksiyonel olarak karakteristik yapılarını kazanırlar. En göze çarpan değişiklik doğumdan hemen sonra meydana gelen solunum kontrol fonksiyonundaki artıştır (35, 36, 38).

Epilepsili annelerin yenidoğanlarında ortalama %7–10 arasında düşük doğum ağırlığı (<2500gr) ve %4–11 arasında prematüriteye rastlandığını bildiren çalışmalara rastlanmıştır (39-43). Hamile olan hayvanların düşüklerinin takip edilmediği bu çalışmada, kontrollere göre yenidoğanların hepsinde prematüre veya düşük doğum ağırlığı saptandı. Deneklerde hamilelik sürelerinin 21. günden daha uzun sürede (24–25.gün) gerçekleşmesi maturasyonun geciktiğinin bir işareti olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada kontrol grubunun ışık mikroskop bulgularında normal sinüzoidal aralıkların ve erişkin sıçan karaciğerine benzer hepatik kordonların görülmesi ve az sayıda mitotik figüre rastlanması ile elektron mikroskopik olarak mitokondrielerin sayıca artmış ve şekillerinin belirginleşmiş olması, normal bir hepatogenez ve maturasyonun varlığının işareti olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubunun aksine deney grubunda ışık mikroskopik olarak genişlemiş sinüzoidlere ve çok sayıda mitotik figürlere rastlanması ve elektron mikroskopik incelemelerde tespit edilen mitokondrielerin kontrole göre sayıca az olması ise denek grubunda hepatogenezde bir gecikme olduğu lehine yorumlanmıştır.

Epileptik annelerde nöbet sırasındaki kasılmalara bağlı olarak yaşanan hipoksik ve obstetrik travma; muhtemelen embriyonun plasental kan akımında azalmalara neden olarak, denk geldiği döneme ait gelişim basamaklarında duraklamalara neden olup organ maturasyonlarında gecikmelere, hatta eksik ya da yanlış gelişime neden olabilir. Daha sağlıklı nesillere sahip olmak için epilepsili annelerin gebelik izlemleri çok iyi takip edilmeli, epileptik konvülsyonlar kontrol altına alınmaya çalışılmalı ve epileptik annelerin yenidoğanları konjenital malformasyonlar ve gelişme geriliği açısından daha dikkatli izlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Sridharan R. Epidemiology of Epilepsy; Special Section: Recent Advances In Epilepsy. Current Science 2002; 82: 664–670.
2. De Bittencourt Prm. Epilepsy in the Tropics: Epidemiology, socioeconomic risk factors, and etiology. Epilepsia 1996; 37:1121–1127.
3. Pedley TA. Epilepsy: A Comprehensive Textbook. Lippincott-Raven, 1998.
4. Cockerell OC, Shorvon SD. Epilepsy: Current concepts. Current Medical Literature, London 1996
5. Hopkins A, Shorvon S, Cascino G. Epilepsy. Chapman-Hall Medical, 1995.
6. Berkovic SF, Scheffer IE. Genetics of the epilepsies. Current opinion in neurology 1999, 12: 177–182.
7. Laidlaw J, Richens A, Chadwick D. A Textbook of Epilepsy. Churchill-Livingstone, 1993.
8. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. Epilepsia 1981; 22: 489–501.
9. Sanjeev VT. Epilepsy and Pregnancy; Special Section: Recent Advances In Epilepsy. Current Science 2002; 82: 720- 730.
10. Spornitz UM, Socin CD, Dravid A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. Anat Rec 1999; 254: 116–126.

11. Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelmann A, Scheidegger B. Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *The Anatomical Record* 1994;238: 163–176.
12. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press Australia, 1982, Plate 25.
13. Turner DA, Buhl EH, Hailer NP, Nitsch R. Morphological features of the entornial hippocampal connection. *Neurobiology* 1998; 55: 537–562.
14. Engel JJ. Experimental animal models of epilepsy; Classification and relevance to human epileptic phenomena. *Epilepsy Res* 1992; 8: 9–20.
15. Fisher RS, Prince DA. Spike-wave rhythms in cat cortex induced by parenteral penicilin, II. Cellular features electroencephalography. *Clinical Electrophysiology* 1977;42:625–639.
16. Anderson AE, Hrachovy RA, Antalffy BA, Armstrong DL, Swann JW. A chronic focal epilepsy with mossy fiber sprouting follows recurrent seizures induced by intrahippocampal tetanus toxin injection in infant rats. *Neuroscience* 1999; 92: 73–82.
17. Galvan D, Hrachovy RA, Smith KL, Swann JW. Blokade of neuronal activity during hippocampal development produces a chronic focal epilepsy in the rat. *The Journal of Neuroscience* 2000; 20 : 2904–2916.
18. Szymusiak R, Shouse MN, Mcginty D. Brainstem stimulation during sleep evokes abnormal rhythmic activity in thalamic neurons in feline penicilin epilepsy. *Brain Research* 1996; 713: 253-260.
19. Zwier U, Eiselt M, Flemming L, Wagner H. Early magnetic field changes preceding the intracortical penicilin induced spikes. *Epilepsy Research* 2000;38: 217–229.
20. Uysal H, Kuli P, Çağlar S. Antiseizure activity of insulin: insulin inhibits pentylentetrazole, penicilin and kainic acid-induced seizures in rats. *Epilepsy Research* 1996;25:185- 190.
21. Marangoz C, Ayyildiz M, Agar E. Evidence that sodium nitroprusside possesses anticonvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport* 1994; 5:2454-2456.
22. Uyanikgil Y, Baka M, Yurtseven M, Turgut M. The effect of experimental epilepsy induced by penicillin administration during pregnancy on nestin expression in the immature rat cerebellum. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Childs Nerv Syst* 2004 ; 20 :176–182.
23. Knight AH, Rhind EG. Epilepsy and pregnancy: a study of 153 pregnancies in 59 patients. *Epilepsia* 1975;16: 99–110.
24. Rohr HP, Wirz A, Henning LC, Riede VN, Bianchi L. Morphometric analysis of the rat liver cell in the prenatal period. *Lab Invest* 1971;24: 128–139.
25. Hommes FA. *Normal and Pathological Development of Energy Metabolism*, London: Academic Press, 1975:1–9.
26. Cuezva JM, Valcarce C, Luis AM, et al. *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate*. New York: Plenum Press, 1990:113–135.
27. Pollak JK, Sutton R. The differentiation of animal mitochondria during development. *Trends Biochem Sci* 1980; 5:23-27.
28. Cuezva JM, Ostronoy LK, Ricart J. et al. Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 1997; 29: 365–377.
29. Jose MM, Casilda LM, Alberto O. Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. *FEBS Letters* 2002;510:127–132.
30. Aprille JR. *Mitochondrial Physiology and Pathology* (Fiskum, G. Ed.), New York: Van Nostrand Reinhold Co.1986: 66–99.
31. Pollak JK, Duck-Chong CG. Changes in rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum during development and differentiation. *Enzyme* 1973;15: 139–160.
32. Aprille JR, Asimakis GK. Postnatal development of rat liver mitochondria: state 3 respiration, adenine nucleotide translocase activity, and the net accumulation of adenine nucleotides. *Arch Biochem Biophys* 1980;201:564–575.
33. David H. Quantitative and qualitative changes in the mitochondria in hepatocytes during postnatal development of male rats. *Exp Pathol* 1979;17: 359–373.
34. Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoy LK, Egea G and Cuezva J M. Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of -F-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 1995;270: 10342–10350.
35. Valcarce C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrustegui J, Cuezva JM. Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 1988; 263: 7767–7775.
36. Almeida A, Lopez MC, Orfao A, Medina JM. Postnatal changes in rhodamine-123 stained mitochondrial populations are sensitive to protein synthesis inhibitors but mimicked in vitro by ATP. *FEBS Lett* 1994; 344: 50–54.
37. Almeida A, Lopez MC, Medina JM. Thyroid Hormones Regulate the Onset of Osmotic Activity of Rat Liver Mitochondria after Birth. *Endocrinology* 1997;138: 764–770.
38. Pollak JK. The maturation of the inner membrane of foetal rat liver mitochondria. *Biochem J* 1975;150: 477–488.
39. Teramo K, Hiilesmaa V, Bardy A, Saarikoski S. Fetal heart rate during a maternal grand mal epileptic seizure. *J Perinat Med* 1979; 7: 3–6.
40. Nakane Y, Okuma T, Takahashi R, et al. Multi-institutional study on the teratogenicity and fetal toxicity of antiepileptic drugs: a report of a collaborative study group in Japan. *Epilepsia* 1980; 21: 663–680.
41. Svigos JM. Epilepsy and pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1984; 24: 182–185.
42. Hvas CL, Henriksen TB, Ostergaard JR, Dam M. Epilepsy and pregnancy: effect of antiepileptic drugs and lifestyle on birthweight. *BJOG* 2000; 107:896–902.
43. Yerby M, Koepsell T, Daling J. Pregnancy complications and outcomes in a cohort of women with epilepsy. *Epilepsia* 1985; 26: 631 – 635.